

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik Erlangen
Direktor: Prof. Dr. N. Henning

Quantitative Antikörperbestimmungen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

zu

Erlangen

Vorgelegt von

Erich Roller

aus Feilitzsch

Dekan: Prof. Dr. N. Henning

Referent: Prof. Dr. N. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 7. 1958

International Archives
of
Allergy and Applied Immunology

Redactors: **R. R. A. Coombs**-Cambridge – **D. Harley**-London – **P. Kallós**-
Helsingborg – **W. Kaufman**-Bridgeport, Conn. – **W. Löffler**-Zürich.

BASEL (Schweiz)

S. KARGER

NEW YORK

Separatum

Vol. 11, No. 5

Printed in Switzerland

Scheiffarth, F., Berg, G., Schuler, E., Götz, H., Frenger, W., und Roller, E.: Int. Arch. Allergy
11: 246—269 (1957)

Quantitative Antikörperbestimmungen

F. SCHEIFFARTH, G. BERG, E. SCHULER, H. GÖTZ, W. FRENGER
und E. ROLLER

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. *N. Henning*)



Quantitative Antikörpermessungen sind erst seit Einführung chemischer Bestimmungsverfahren möglich geworden, die im Prinzip auf *Heidelberger* und Mitarb. zurückgehen. Sie gestatten die Erfassung im Serum vorkommender Antikörper auf Grund von Stickstoff-Bestimmungen. Der große Aufwand derartiger Untersuchungen bringt es jedoch mit sich, daß nur vereinzelt Ergebnisse über quantitative Antikörpermessungen vorliegen. Mit der Entwicklung neuerer Methoden zur Lokalisation der Antikörper in den Serumglobulinfraktionen war es möglich, derartige Messungen unter Berücksichtigung dieser Fraktionen vorzunehmen. Zu dieser Frage sollten die nachfolgend mitgeteilten Untersuchungen einen Beitrag liefern. Die Anwendung neuer immunologischer Untersuchungsverfahren gestatteten dabei gleichzeitig eine genauere Analyse des verwendeten Antigens.

Durch eine statistische Auswertung sollte ferner versucht werden, Beziehungen zwischen den mit immunchemischen und serologischen Methoden ermittelten Werten nachzuweisen, und so gewisse allgemein gültige Aussagen über die Antikörperbildung unter Berücksichtigung quantitativer Angaben zu machen.

Versuchsanordnung und Methodik

Tiermaterial: Die nachfolgend mitgeteilten Untersuchungen wurden an insgesamt 10 Kaninchen vorgenommen. 6 Tiere wurden dabei erstmalig sensibilisiert (*Gruppe I*), die 4 restlichen Tiere

(Gruppe II) waren 6 Monate zuvor mit dem gleichen Antigen sensibilisiert worden.

Das durchschnittliche Körpergewicht der Versuchstiere betrug bei Versuchsbeginn 3 300 g, am Ende des Versuchs lag es bei 3 200 g. Die beobachtete Differenz ist bei statistischer Überprüfung als zufällig anzusehen.

Antigen: Zur Analyse des Pferdeserums wurden folgende Untersuchungen vorgenommen:

1. Gesamteiweißbestimmung,
2. Elektrophorese,
3. Immunoelektrophoretische Untersuchungen zur Frage der antigenen Wirksamkeit der einzelnen Serumproteinfraktionen.

Modus der Sensibilisierung: Alle Tiere erhielten während der Dauer des Versuchs jeden zweiten Tag eine intravenöse Injektion von 0.5 ml Pferdeserum, so daß bei den einzelnen Kontrollen des Antikörpergehaltes des Serums der Versuchstiere folgende Antigenmengen appliziert waren:

Tabelle 1

	Pferdeserum	Antigeneiweiß
Einzelinjektion	0.5 ml	21.31 mg
1. Kontrolle	2.0 ml	85.25 mg
2. Kontrolle	4.0 ml	170.25 mg
3. Kontrolle	6.0 ml	255.75 mg

Kontrolluntersuchungen: Alle Ausgangswerte – außer Hämagglutinationstiter – wurden vor Versuchsbeginn ermittelt, Kontrolluntersuchungen wurden am 9., 17. und am 25. Versuchstag vorgenommen. Hierzu wurden den Tieren jeweils ca. 15 ml Blut steril aus einer Ohrvene entnommen. Das Serum wurde nach Gerinnung und vorsichtigem Abzentrifugieren im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Untersuchungsmethoden: Der Serumgesamteiweißgehalt wurde nach dem Mikro-Kjeldahl-Verfahren durch Bestimmung des Serumgesamtstickstoffs und des Reststickstoffs ermittelt.

Die Analyse der Serumproteine wurde mit der Papierelektrophorese vorgenommen (8). Der qualitative Antikörpernachweis erfolgte mit der Agglutinationselektrophorese und der Immuno-elektrophorese, die gleichzeitig eine Lokalisation des Antikörpers gestatten.

Bei der *Agglutinationselektrophorese* wird das zu untersuchende Serum papierelektrophoretisch in üblicher Weise getrennt. Am Rand des noch feuchten Elektrophoresestreifens werden antigen-beladene Hammelerythrocyten aufgetragen. In antikörperfreie Fraktionen diffundieren die Erythrocyten ungehindert zur Mitte des Streifens, während in der antikörperhaltigen Fraktion eine Ausbreitung infolge Agglutination unterbleibt (1, 25).

Bei der *Immunoelektrophorese* wird das Immunsrum im Agar-milieu elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Zugabe des spezifischen Antigens in einen der Längsseite entlang ausgehobenen Kanal treten an den Berührungsstellen von Antigen und antikörperhaltigem Immunsrum Präzipitationslinien auf (7, 9, 10, 11, 26, 30).

Zur Bestimmung des *Hämagglutinationstiters* wurden tanninvor-behandelte und mit dem Antigen beladene Hammelerythrocyten verwendet. Als Endtiter wurde diejenige Serumverdünnung gewertet, die noch die hinzugefügte mit Antigen beladene Erythrocyten-Suspension agglutinierte (4, 3, 22, 27).

Die Bestimmung des *Präzipitinstickstoffes* (*Antikörpereiweiß*) erfolgte nach der von *Heidelberger* und *Kendall* angegebenen Methode (12, 13, 14, 20). Dabei läßt man konstante Mengen des zu untersuchenden, bei 56° C inaktivierten Serums mit dem verwendeten Antigen in einer Reihe fallender Konzentrationen reagieren. Das entstehende Präzipitat wird in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit abgehoben. Nach mehrfachem Waschen des Präzipitats mit physiologischer Kochsalzlösung wird der Stickstoffgehalt nach dem Mikro-Kjeldahl-Verfahren ermittelt. Dieser wird um den Wert des hinzugefügten Antigeneiweiß be-reinigt.

Zur Entscheidung der Frage, ob bei der Präzipitation der im Serum befindliche Antikörper tatsächlich vollständig verbraucht wird, wurde geprüft, ob in der überstehenden Flüssigkeit noch Antikörper vorhanden waren. Hierzu wurde die von *Ouchterlony* u. a. angegebene Methode der Präzipitation im Gelmilieu verwendet (3, 21, 23, 24).

Geprüft wurden die Serumverdünnungen, die eine maximale Präzipitation zeigten, sowie die nächst niedrigere und nächst höhere Konzentration. Es wurde ferner kontrolliert, ob alles zugegebene Antigen für die Präzipitation verbraucht wurde, wozu als Testserum das Serum eines Tieres verwendet wurde, das den höchsten Antikörpertiter aufwies.

Zur Untersuchung der Eiweißmengenverhältnisse nach der Präzipitation wurde die überstehende Serumflüssigkeit – nach der Präzipitation – erneut auf den Eiweißgehalt durch Bestimmung des Gesamtstickstoffs geprüft.

Zum Vergleich wurde der theoretisch errechnete Eiweißwert herangezogen, der sich aus dem Serumgesamteiweiß plus dem hinzugefügten Antigeneiweiß minus dem Präzipitateiweiß ergibt und mit dem erhaltenen Eiweißwert nach der Präzipitation auf Abhängigkeit untersucht.

Die Mengenverhältnisse wurden prozentual auf einen ml umgerechnet, da eine genaue Bestimmung des Volumens nicht möglich war.

Ergebnisse

I. Antigenanalyse

Der nach *Kjeldahl* bestimmte Gesamteiweißwert des verwendeten Pferdeserums betrug 42.63 mg/ml (Gesamtstickstoff 8.38 mg/ml, Reststickstoff 1.6 mg/ml).

Die elektrophoretische Analyse für die einzelnen Fraktionen ergab folgende Werte:

Tabelle 2

Fraktion:	rel. %	mg/ml
Albumin	26.07	11.116
α_1 -Globulin	5.28	2.250
α_2 -Globulin	15.18	6.470
β -Globulin	26.73	11.394
γ -Globulin	26.73	11.394

Albumin/Globulin Quotient: 0.353

Die immunoelektrophoretischen Untersuchungen ergaben, daß alle Serumfraktionen als Antigen wirksam waren (Abb. 1).

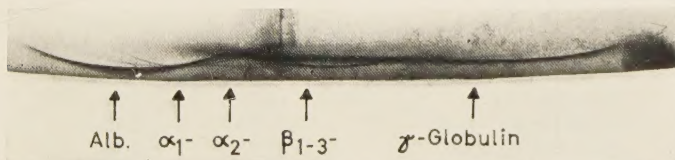


Abb. 1. Immunoelektrophorese des als Antigen verwendeten Pferdeserums, präzipitiert gegen Antipferde-Kaninchenserum. Danach sind alle Serumeiweißfraktionen als Antigen wirksam.

II. Lokalisation des Antikörpers

Der agglutinierende oder präzipitierende Antikörper konnte sowohl mit der Agglutinationselektrophorese (Abb. 2b) als auch mit der Immunoelktrophorese (Abb. 2a) im Bereich der γ -Globulin-Fraktion nachgewiesen werden. In beiden Fällen wurde das antikörperhaltige Serum elektrophoretisch aufgetrennt und das spezifische Antigen (Pferdeserum) zur Agglutination bzw. Präzipitation an der Längsseite des getrennten Serums hinzugefügt.

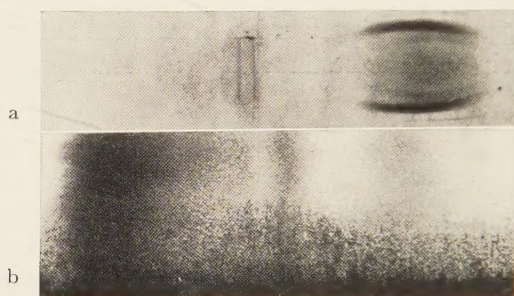


Abb. 2. a) und b): Erklärung siehe Text!

III. Untersuchung der Gruppendurchschnitte auf wesentliche Unterschiede*

Mit Hilfe der einfachen Streuungszerlegung wurde untersucht, ob zwischen den Gruppendurchschnitten der Gesamteiweißwerte, der Serumprotein-Fractionen, des Agglutinationstiters und der Präzipitineiwerte wesentliche Abweichungen bestehen. Außerdem sollte geprüft werden, ob bei einer Gegenüberstellung der Kontrollen mit den jeweiligen vorhergehenden Kontrollen wesentliche Unterschiede zu ermitteln sind.

a) Die Gesamteiweiß-Werte (mg/ml Serum). Der Mittelwert sämtlicher Ausgangswerte betrug 64.35 mg/ml. Das errechnete $F = 0.967$ läßt wesentliche Unterschiede nicht erwarten.

Das weitere Verhalten der Durchschnittswerte in Gruppe I und II während des Versuchs zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3

	Gruppe I	Gruppe II
Ausgangswert	66.87	61.83
1. Kontrolle	67.85	72.15
2. Kontrolle	62.46	73.14
3. Kontrolle	75.82	75.92

*Alle verwendeten statistischen Verfahren sind dargestellt bei A. Linder: Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Basel 1951.

Wesentliche Unterschiede sind aus Tabelle 4 ersichtlich.

Tabelle 4

	Differenz der Mittelwerte	t	Sicherung
2. Kontrolle I gegen II	+ 10.60	4.229	P = 0.01

Ein Vergleich der Mittelwerte bei Versuchsbeginn mit denen der einzelnen Kontrollen, sowie der Kontrollen untereinander ergibt während des Versuchs für Gruppe I folgende wesentliche Unterschiede.

Tabelle 5

	Differenz der Mittelwerte	t	Sicherung
2. Kontrolle/ 3. Kontrolle	+ 13.36	3.446	P = 0.01

Bei entsprechender Prüfung ergeben sich für Gruppe II folgende wesentliche Unterschiede.

Tabelle 6

	Differenz der Mittelwerte		Sicherung
Ausgangswert/ 2. Kontrolle	+ 11.31	3.834	P = 0.01
Ausgangswert/ 3. Kontrolle	+ 14.09	4.067	P = 0.01

b) Die Serumprotein-Fractionen (mg/ml):

1. Die *Albumin-Fraktion*: Der Mittelwert aller Ausgangswerte lag bei 34.60 mg/ml. Das errechnete $F = 0.316$ läßt wesentliche Unterschiede nicht erwarten.

Das weitere Verhalten der Durchschnittswerte in Gruppe I und II während des Versuchs zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7

	Gruppe I	Gruppe II
Ausgangswert	34.04	35.16
1. Kontrolle	32.53	33.03
2. Kontrolle	29.76	30.89
3. Kontrolle	36.44	31.30

Wesentliche Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppe I und Gruppe II sind bei einem t von 0.138 (1. Kontrolle), t von 0.611 (2. Kontrolle) und t von 1.601 (3. Kontrolle) nicht zu ermitteln.

Ein Vergleich der Mittelwerte bei Versuchsbeginn mit denen der einzelnen Kontrollen, sowie der Kontrollen untereinander ergibt während des Versuchs für Gruppe I folgende wesentliche Unterschiede.

Tabelle 8

	Differenz der Mittelwerte	t	Sicherung
Ausgangswert/ 2. Kontrolle	+ 4.28	2.346	P = 0.05
2. Kontrolle/ 3. Kontrolle	+ 6.68	2.323	P = 0.05

Bei entsprechender Prüfung ergeben sich für Gruppe II keine wesentlichen Unterschiede.

2. Die α_1 -Globulin-Fraktion (mg/ml): Der Mittelwert aller Ausgangswerte lag bei 1.62 mg/ml. Das errechnete $F = 2.422$ läßt wesentliche Unterschiede nicht erwarten.

Das weitere Verhalten der Durchschnittswerte in Gruppe I und Gruppe II während des Versuchs zeigt Tabelle 9.

Tabelle 9

	Gruppe I	Gruppe II
Ausgangswert	1.72	1.52
1. Kontrolle	3.70	2.97
2. Kontrolle	2.09	1.92
3. Kontrolle	2.39	3.27

Wesentliche Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppe I und Gruppe II sind bei einem t von 0.512 (1. Kontrolle), t von 0.342 (2. Kontrolle) und t von 2.198 (3. Kontrolle) nicht zu ermitteln.

Ein Vergleich der Mittelwerte bei Versuchsbeginn mit denen der einzelnen Kontrollen während des Versuchs ergibt für Gruppe I keinen statistisch gesicherten Unterschied.

Bei entsprechender Prüfung ergeben sich für Gruppe II folgende wesentliche Unterschiede:

Tabelle 10

	Differenz der Mittelwerte	<i>t</i>	Sicherung
Ausgangswert/ 1. Kontrolle	+ 1.45	6.359	P = 0.001
Ausgangswert/ 3. Kontrolle	+ 1.75	6.075	P = 0.001
1. Kontrolle/ 2. Kontrolle	— 1.05	3.509	P = 0.05
2. Kontrolle/ 3. Kontrolle	+ 1.35	3.888	P = 0.05

3. Die α_2 -Globulin-Fraktion (mg/ml): Der Mittelwert aller Ausgangswerte lag bei 5.67 mg/ml. Das errechnete $F = 1.021$ läßt wesentliche Unterschiede nicht erwarten.

Das weitere Verhalten der Durchschnittswerte in Gruppe I und Gruppe II während des Versuchs zeigt Tabelle 11.

Tabelle 11

	Gruppe I	Gruppe II
Ausgangswert	6.33	5.02
1. Kontrolle	6.66	6.96
2. Kontrolle	6.60	6.69
3. Kontrolle	6.86	6.53

Wesentliche Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppe I und Gruppe II sind bei einem t von 2.012 (1. Kontrolle), t von 0.138 (2. Kontrolle) und t von 0.103 (3. Kontrolle) nicht zu ermitteln.

Ein Vergleich der Mittelwerte bei Versuchsbeginn mit denen der einzelnen Kontrollen sowie der Kontrollen untereinander während des Versuchs ergibt für Gruppe I keinen statistisch gesicherten Unterschied.

Bei entsprechender Prüfung ergeben sich für Gruppe II folgende wesentliche Unterschiede.

Tabelle 12

	Differenz der Mittelwerte	<i>t</i>	Sicherung
Ausgangswert/ 1. Kontrolle	+ 1.94	3.456	P = 0.05
Ausgangswert/ 3. Kontrolle	+ 1.51	3.303	P = 0.05

4. Die α_3 -Globulin-Fraktion (mg/ml): Der Mittelwert aller Ausgangswerte lag bei 3.16 mg/ml. Das errechnete $F = 8.315$ läßt mit

einem $P = 0.05$ Unterschiede vermuten, nach der t -Verteilung ist dieser Unterschied bei einem $t = 0.043$ nicht zu sichern.

Das weitere Verhalten der Durchschnittswerte in Gruppe I und Gruppe II während des Versuchs zeigt Tabelle 13.

Tabelle 13

	Gruppe I	Gruppe II
Ausgangswert	3.17	3.15
1. Kontrolle	4.07	3.15
2. Kontrolle	2.86	3.01
3. Kontrolle	3.62	3.33

Wesentliche Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppe I und Gruppe II sind bei einem t von 1.541 (1. Kontrolle), t von 0.449 (2. Kontrolle) und t von 0.651 (3. Kontrolle) nicht zu ermitteln.

Ein Vergleich der Mittelwerte bei Versuchsbeginn mit denen der einzelnen Kontrollen, sowie der Kontrollen untereinander ergibt während des Versuchs für Gruppe I folgende wesentliche Unterschiede.

Tabelle 14

	Differenz der Mittelwerte	t	Sicherung
1. Kontrolle/ 2. Kontrolle	— 1.21	2.564	$P = 0.05$
2. Kontrolle/ 3. Kontrolle	+ 0.76	2.738	$P = 0.05$

Bei entsprechender Prüfung ergeben sich für Gruppe II keine wesentlichen Unterschiede.

5. Die β -Globulin-Fraktion (mg/ml): Der Mittelwert aller Ausgangswerte lag bei 6.36 mg/ml. Das errechnete $F = 10.599$ läßt mit einem $P = 0.05$ einen Unterschied vermuten, nach der t -Verteilung ist dieser Unterschied bei einem $t = 1.714$ nicht zu sichern.

Das weitere Verhalten der Durchschnittswerte in Gruppe I und Gruppe II während des Versuchs zeigt Tabelle 15.

Tabelle 15

	Gruppe I	Gruppe II
Ausgangswert	7.21	5.51
1. Kontrolle	8.09	8.65
2. Kontrolle	7.53	8.44
3. Kontrolle	8.29	8.73

Wesentliche Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppe I und Gruppe II sind bei einem t von 0.816 (1. Kontrolle) t von 1.796 (2. Kontrolle) und t von 2.198 (3. Kontrolle) nicht zu ermitteln.

Ein Vergleich der Mittelwerte bei Versuchsbeginn mit denen der einzelnen Kontrollen sowie der Kontrollen untereinander ergibt für Gruppe I keinen statistisch gesicherten Unterschied.

Bei entsprechender Prüfung ergeben sich für Gruppe II folgende wesentliche Unterschiede.

Tabelle 16

	Differenz der Mittelwerte	t	Sicherung
Ausgangswert/ 1. Kontrolle	+ 3.14	4.685	P = 0.01
Ausgangswert/ 2. Kontrolle	+ 2.93	8.094	P = 0.001
Ausgangswert/ 3. Kontrolle	+ 3.22	5.052	P = 0.001

6. Die γ -Globulin-Fraktion (mg/ml): Der Mittelwert aller Ausgangswerte lag bei 12.84 mg/ml. Das errechnete $F = 2.338$ läßt wesentliche Unterschiede nicht erwarten.

Das weitere Verhalten der Durchschnittswerte in Gruppe I und Gruppe II während des Versuchs zeigt Tabelle 17.

Tabelle 17

	Gruppe I	Gruppe II
Ausgangswert	14.41	11.47
1. Kontrolle	12.96	17.49
2. Kontrolle	14.32	22.19
3. Kontrolle	18.07	22.76

Wesentliche Unterschiede sind aus Tabelle 18 ersichtlich.

Tabelle 18

	Differenz der Mittelwerte	t	Sicherung
2. Kontrolle I gegen II	+ 7.87	4.001	P = 0.01

Ein Vergleich der Mittelwerte bei Versuchsbeginn mit denen der einzelnen Kontrollen, sowie der Kontrollen untereinander ergibt für Gruppe I keinen statistisch gesicherten Unterschied.

Bei entsprechender Prüfung ergeben sich für Gruppe II folgende wesentliche Unterschiede.

Tabelle 19

	Differenz der Mittelwerte	<i>t</i>	Sicherung
Ausgangswert/ 1. Kontrolle	+ 6.02	2.692	P = 0.05
Ausgangswert/ 2. Kontrolle	+ 10.72	4.769	P = 0.01
Ausgangswert/ 3. Kontrolle	+ 11.29	3.381	P = 0.05

c) Der *Haemagglutinationstiter* ($^2\log$): Der Mittelwert aller Werte der 1. Kontrolle betrug 6.25 $^2\log$. Das errechnete F = 0.1049 läßt wesentliche Unterschiede nicht erwarten.

Das weitere Verhalten der Durchschnittswerte in Gruppe I und Gruppe II während des Versuchs zeigt Tabelle 20.

Tabelle 20

	Gruppe I	Gruppe II
1. Kontrolle	3.50	9.00
2. Kontrolle	6.83	10.75
3. Kontrolle	10.34	11.50

Wesentliche Unterschiede sind aus Tabelle 21 ersichtlich.

Tabelle 21

	Differenz der Mittelwerte	<i>t</i>	Sicherung
1. Kontrolle I gegen II	+ 5.50	10.289	P = 0.001
2. Kontrolle I gegen II	+ 3.92	6.240	P = 0.001

Ein Vergleich der Mittelwerte bei der ersten Kontrolle mit denen der anderen Kontrollen, sowie der Kontrollen untereinander während des Versuchs ergibt für Gruppe I folgende wesentliche Unterschiede.

Tabelle 22

	Differenz der Mittelwerte	<i>t</i>	Sicherung
1. Kontrolle/ 2. Kontrolle	+ 3.33	5.682	P = 0.001
1. Kontrolle/ 3. Kontrolle	+ 6.84	11.402	P = 0.001
2. Kontrolle/ 3. Kontrolle	+ 3.51	5.102	P = 0.001

Bei entsprechender Prüfung ergeben sich für Gruppe II folgende wesentliche Unterschiede.

Tabelle 23

	Differenz der Mittelwerte	<i>t</i>	Sicherung
1. Kontrolle/ 2. Kontrolle	+ 1.75	3.657	P = 0.05
1. Kontrolle/ 3. Kontrolle	+ 2.50	4.999	P = 0.01

d) Die *Präzipitin-Eiweißwerte* (mg/ml Serum): Der Mittelwert aller Ausgangswerte lag bei 0.348 mg/ml. Das errechnete $F = 0.283$ läßt wesentliche Unterschiede nicht erwarten.

Das weitere Verhalten der Durchschnittswerte in Gruppe I und Gruppe II während des Versuchs zeigt Tabelle 24.

Tabelle 24

	Gruppe I	Gruppe II
Ausgangswerte	0.236	0.460
1. Kontrolle	0.501	6.305
2. Kontrolle	1.797	13.491
3. Kontrolle	4.010	14.621

Wesentliche Unterschiede sind aus Tabelle 25 ersichtlich.

Tabelle 25

	Differenz der Mittelwerte	<i>t</i>	Sicherung
1. Kontrolle/ I gegen II	+ 5.804	4.225	P = 0.01
2. Kontrolle I gegen II	+ 11.694	10.731	P = 0.001
3. Kontrolle I gegen II	+ 10.611	5.367	P = 0.001

Ein Vergleich der Mittelwerte bei Versuchsbeginn mit denen der einzelnen Kontrollen, sowie der Kontrollen untereinander während des Versuchs ergibt für Gruppe I folgende wesentliche Unterschiede.

Tabelle 26

	Differenz der Mittelwerte	t	Sicherung
Ausgangswert/ 1. Kontrolle	+ 0.265	7.033	P = 0.001
Ausgangswert/ 2. Kontrolle	+ 1.561	6.092	P = 0.001
Ausgangswert/ 3. Kontrolle	+ 3.774	3.427	P = 0.01
1. Kontrolle/ 2. Kontrolle	+ 1.296	5.109	P = 0.001

Bei entsprechender Prüfung ergeben sich für Gruppe II folgende wesentliche Unterschiede:

Tabelle 27

	Differenz der Mittelwerte	t	Sicherung
Ausgangswert/ 1. Kontrolle	+ 5.845	3.358	P = 0.05
Ausgangswert/ 2. Kontrolle	+ 13.031	9.853	P = 0.001
Ausgangswert/ 3. Kontrolle	+ 14.161	^a 7.874	P = 0.001
1. Kontrolle/ 2. Kontrolle	+ 7.186	3.293	P = 0.05

IV. Untersuchungen auf Abhängigkeiten

Es soll geprüft werden, ob Abhängigkeiten nachzuweisen sind zwischen den Werten des Serum-Gesamteiweißes, der Antigen-Dosis, der Serumprotein-Fractionen, des Agglutinationstiter und des Präzipitin-Eiweißes.

Tabelle 28

Beziehungen zwischen	Korrelations- koeffizient r	Bestimmtheit B	Sicherung
<i>Gruppe I</i>			
Gesamteiweiß/Antigendosis	0.3962	0.1568	—
Albumin/Antigendosis	0.3026	0.0916	—
α_1 -Globulin/Antigendosis	0.2922	0.0854	—
α_2 -Globulin/Antigendosis	0.0238	0.000568	—
α_3 -Globulin/Antigendosis	0.2420	0.0586	—
β -Globulin/Antigendosis	0.00793	0.0000629	—
γ -Globulin/Antigendosis	0.5522	0.3049	—
Präzipitineiweiß/Antigendosis	0.2508	0.0629	—
Agglutinationstiter/Antigendosis	0.8491	0.7224	P = 0.001
γ -Globulin/Agglutinationstiter	0.714	0.510	P = 0.01
γ -Globulin/Präzipitineiweiß	0.673	0.453	P = 0.05
Präzipitineiweiß/Agglutinationstiter	0.624	0.390	P = 0.05

Gruppe II

Gesamteiweiß/Antigendosis	0.2561	0.0656	—
Albumin/Antigendosis	0.3549	0.126	—
α_1 -Globulin/Antigendosis	0.3049	0.093	—
α_2 -Globulin/Antigendosis	0.2469	0.061	—
α_3 -Globulin/Antigendosis	0.0721	0.0052	—
β -Globulin/Antigendosis	0.0694	0.00483	—
γ -Globulin/Antigendosis	0.3841	0.1475	—
Präzipitineiß/Antigendosis	0.6971	0.4860	P = 0.05
Agglutinationstiter/Antigendosis	0.8276	0.6847	P = 0.001
γ -Globulin/Agglutinationstiter	0.714	0.510	P = 0.01
γ -Globulin/Präzipitineiß	0.8246	0.6802	P = 0.001
Präzipitineiß/Agglutinationstiter	0.854	0.729	P = 0.001

V. Prüfung auf vollständige Präzipitation:

a) Bei 90 Kontrolluntersuchungen konnten in 9 Fällen mit Hilfe der Methode nach *Ouchterlony* noch Antikörper in der «überstehenden Flüssigkeit» nach Präzipitation festgestellt werden, in 34 Fällen fand sich noch ein Überschuß an Antigen in der «überstehenden Flüssigkeit».

Tabelle 29

<i>Gruppe</i>	<i>Antikörper- überschuß</i>	<i>Antigen- überschuß</i>
Gruppe I	5	28
Gruppe II	4	6
zusammen	9 = 10%	34 = 37.7%

b) Untersuchung auf Abhängigkeit. Es soll geprüft werden, ob eine Abhängigkeit besteht zwischen dem berechneten Eiweißwert nach der Präzipitation und der erhaltenen Eiweißmenge.

Tabelle 30

<i>Beziehungen zwischen</i>	<i>Korrelations- koeffizient r</i>	<i>Bestimmtheit B</i>	<i>Sicherung</i>
berechnetem Eiweißwert und erhaltenem Eiweißwert	0.63	0.4048	P = 0.001

Diskussion

Faßt man die vorliegenden Ergebnisse zusammen, so ergibt sich:

Die mit sämtlichen Methoden ermittelten Ausgangswerte liegen in keinem Fall außerhalb des Zufallbereichs.

I. Nach Ermittlung der Werte für die Serumproteinfraktionen zeigte die weitere immunoelektrophoretische Untersuchung, daß alle Fraktionen als Antigen wirksam waren.

II. Die agglutinierenden und präzipitierenden Antikörper wurden in der γ -Globulin-Fraktion nachgewiesen.

III. Untersuchungen auf Unterschiede:

Am 9. Versuchstag liegen gegenüber den Ausgangswerten folgende wesentliche Abweichungen vor:

A. 1. *Serum-Proteine*:

- a) α_1 -Globuline: Zunahme in Gruppe II
- b) α_2 -Globuline: Zunahme in Gruppe II
- c) β -Globuline: Zunahme in Gruppe II
- d) γ -Globuline: Zunahme in Gruppe II

2. *Präzipitineweiß*: Zunahme in Gruppe I und in Gruppe II.

B. Zwischen den Mittelwerten der beiden Gruppen bestehen folgende wesentliche Unterschiede:

- 1. Der *Haemagglutinationstiter* liegt in Gruppe II deutlich höher als in Gruppe I.
- 2. Das *Präzipitineweiß* weist in Gruppe II deutlich höhere Werte auf als in Gruppe I.

Am 17. Versuchstag liegen gegenüber den Ausgangswerten folgende wesentliche Abweichungen vor:

A. *Gesamteiweiß*: Zunahme in Gruppe II

1. *Serum-Proteine*:

- a) Albumin-Fraktion: Abnahme in Gruppe I
- b) β -Globuline: Zunahme in Gruppe II
- c) γ -Globuline: Zunahme in Gruppe II

3. *Präzipitineweiß*: Zunahme in Gruppe I und in Gruppe II.

B. Gegenüber der 1. Kontrolle liegen folgende wesentliche Abweichungen vor:

1. *Serum-Proteine*:

- a) α_1 -Globuline: Abnahme in Gruppe II
- b) α_3 -Globuline: Abnahme in Gruppe I

2. *Präzipitineweiß*: Zunahme in Gruppe I und Gruppe II.

3. *Haemagglutinationstiter*: Zunahme in Gruppe I und Gruppe II

C. Zwischen den Mittelwerten der beiden Gruppen bestehen folgende wesentliche Unterschiede:

1. Das *Gesamteiweiß* liegt in Gruppe II deutlich höher als in Gruppe I.
2. Die γ -Globuline liegen in Gruppe II deutlich höher als in Gruppe I.
3. Der *Haemagglutinationstiter* liegt in Gruppe II deutlich höher als in Gruppe I.
4. Das *Präzipitineiß* weist in Gruppe II deutlich höhere Werte als in Gruppe I auf.

Am 25. Versuchstag liegen gegenüber den *Ausgangswerten* folgende wesentliche Abweichungen vor:

A. *Gesamteiweiß*: Zunahme in Gruppe II.

2. *Serum-Proteine*:

- a) α_1 -Globuline: Zunahme in Gruppe II
- b) α_2 -Globuline: Zunahme in Gruppe II
- c) β -Globuline: Zunahme in Gruppe II
- d) γ -Globuline: Zunahme in Gruppe II

3. *Haemagglutinationstiter*: Zunahme in Gruppe I und Gruppe II

4. *Präzipitineiß*: Zunahme in Gruppe I und Gruppe II.

B. Gegenüber der 2. *Kontrolle* liegen folgende wesentliche Abweichungen vor:

1. *Gesamteiweiß*: Zunahme in Gruppe I

2. *Serum-Proteine*:

- a) Albumin-Fraktion: Zunahme in Gruppe I
- b) α_1 -Globuline: Zunahme in Gruppe II
- c) α_3 -Globuline: Zunahme in Gruppe I

3. *Haemagglutinationstiter*: Zunahme in Gruppe I.

C. Zwischen den *Mittelwerten* der beiden Gruppen bestehen folgende wesentliche Unterschiede:

Das *Präzipitineiß* weist in Gruppe II deutlich höhere Werte als in Gruppe I auf.

IV. Untersuchungen auf Abhängigkeiten.

Gruppe I

1. In Gruppe I lassen sich Abhängigkeiten zwischen *Gesamteiweiß* und *Antigendosis*, sowie den einzelnen *Serum-Fractionen* und *Antigendosis* nicht nachweisen.

2. Zwischen *Präzipitineiß* und *Antigendosis* läßt sich keine Abhängigkeit feststellen, dagegen ist sie zwischen *Agglutinationstiter* und *Antigendosis* weitgehend gesichert.

3. Abhängigkeiten zwischen γ -Globulin und Agglutinationstiter, γ -Globulin und Präzipitineiweiß, Präzipitineiweiß und Agglutinationstiter lassen sich feststellen.

Gruppe II

1. In Gruppe II lassen sich Abhängigkeiten zwischen Gesamteiweiß und Antigendosis, sowie den einzelnen Serum-Proteinen und Antigendosis nicht nachweisen.

2. Zwischen Präzipitineiweiß und Antigendosis besteht eine Abhängigkeit, zwischen Agglutinationstiter und Antigendosis ist sie weit aus gesichert.

3. Abhängigkeiten zwischen γ -Globulin und Agglutinationstiter, γ -Globulin und Präzipitineiweiß, Präzipitineiweiß und Agglutinationstiter lassen sich feststellen, sie sind zum Teil weitaus gesichert.

V. Die Prüfung auf vollständige Präzipitation ergab, daß mit der angewandten Technik praktisch alle präzipitierenden Antikörper erfaßt wurden, und daß sich eine gute Übereinstimmung zu den errechneten Werten erreichen ließ.

Voraussetzung für eine qualitative und quantitative Antikörperbestimmung war eine möglichst genaue Definition des verwendeten Antigens. Während die Bestimmung des Gesamteiweißes ein genaues Maß für die applizierte Eiweißmenge ermöglichte, und durch die Elektrophorese gleichzeitig der Anteil der verschiedenen Proteinfractionen bestimmt wurde, ergab die Immunelektrophorese, daß alle Serumfraktionen des verwendeten Pferdeserums antigene Eigenschaften besitzen (Abb. 1).

Die Untersuchungen zur Lokalisation des Antikörpers ergaben, daß er immer in der γ -Globulin-Fraktion nachzuweisen ist (2, 18, 19) (Abb. 2). Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb der γ -Globulin-Wert verwendet und sein Verhalten während des Versuchs mit dem Haemagglutinationstiter und dem Präzipitineiweiß verglichen.

Über diese speziellen Fragen hinaus kommt den Lokalisationsergebnissen auch insofern grundsätzliche Bedeutung zu, als sie einen weiteren Beitrag zur Antikörperlokalisation innerhalb der Serumproteine unter experimentellen Bedingungen liefern.

Als Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen ist grundsätzlich festzustellen, daß enge Beziehungen zwischen dem γ -Globulin, Haemagglutinationstiter und Präzipitineiweiß bestehen. Jedoch sind

die zeitlichen wie die quantitativen Verhältnisse der Antikörperbildung in beiden Gruppen verschieden (Abb. 3). Dies wird ohne weiteres verständlich, wenn man bedenkt, daß Gruppe I erstmalig, Gruppe II nach einem Intervall von 6 Monaten zum zweiten Mal mit Pferdeserum sensibilisiert wurde.

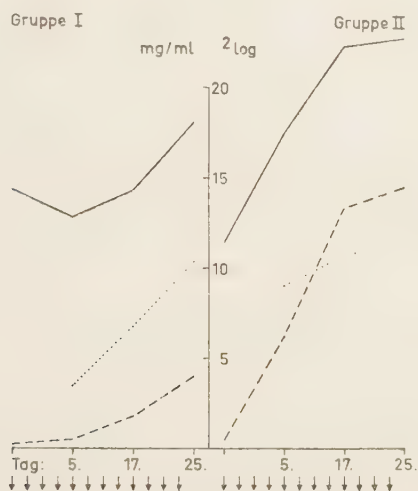


Abb. 3. Darstellung der Beziehungen zwischen γ -Globulin, Hämaggglutinationstiter und Präzipitineiß, die bei beiden Gruppen praktisch gleichsinniges Verhalten zeigen. In Gruppe II (wiederholte Sensibilisierung) erfolgt die Antikörperbildung rascher und erreicht, gemessen an den gefundenen Werten, ein größeres Ausmaß als in Gruppe I.

In Gruppe I nimmt das Präzipitineiß während der Dauer des Versuchs kontinuierlich zu, desgleichen der Haemaggglutinationstiter, während das γ -Globulin erst gegen Ende des Versuchs erhöhte Werte aufweist. Der Anstieg des Präzipitineißes ist nicht nur bei Vergleich der Kontrolluntersuchungen gegenüber den Ausgangswerten, sondern auch bei Gegenüberstellung der jeweiligen vorhergehenden Kontrolle deutlich (Tab. 26).

Ähnlich verhält sich der Haemaggglutinationstiter, sein Anstieg ist allerdings nur vom 9. Versuchstag ab feststellbar und von diesem Zeitpunkt auch bei Gegenüberstellung der jeweiligen vorhergehenden Kontrolle deutlich nachweisbar (Tab. 22).

Dementsprechend läßt sich die Abhängigkeit zwischen Präzipitineiß und Agglutinationstiter statistisch sichern (Tab. 28).

Eine Zunahme des γ -Globulins erfolgt erst gegen Versuchsende (29). Dementsprechend zeigt das γ -Globulin erst gegen Ende

des Versuchs ein dem Präzipitineiß und Agglutinationstiter paralleles Verhalten, trotzdem lassen sich Abhängigkeiten zwischen dem Präzipitineiß und γ -Globulin, sowie dem Agglutinationstiter und γ -Globulin statistisch sichern (Tab. 28).

Diese Befunde zeigen, daß Präzipitineiß, Haemagglutinationstiter und γ -Globulin als Maßstab gebildeter Antikörper zu werten sind. Die Bestimmung des Präzipitin-Stickstoffs erlaubt dabei seine quantitative Erfassung. Für den Agglutinationstiter gilt dies nur unter gewissen Voraussetzungen. Es muß zuvor die optimal agglutinable – chemisch definierte – Antigenmenge bestimmt werden, mit der dann die Titerbestimmung vorgenommen wird, so daß sich schließlich die agglutinierte Antikörpermenge berechnen läßt. Ohne diese Voraussetzung ist ihr nur der Wert einer qualitativen Probe beizumessen; daß diese dann zu den empfindlichsten Antikörpernachweisverfahren zu rechnen ist und im vorliegenden Falle der Haemagglutinationstiter die Präzipitin-Stickstoffbestimmung an Empfindlichkeit übertrifft, zeigt die enge Abhängigkeit zwischen Agglutinationstiter und Antigendosis. Eine Abhängigkeit zwischen Präzipitineiß und Antigendosis entzieht sich im vorliegenden Falle einem Nachweis, daß sie tatsächlich besteht, zeigen die Ergebnisse in Gruppe II, trotz der geringeren Zahl der Versuchstiere.

Das Verhalten des Gesamteiweißes zeigt erst im letzten Drittel des Versuchs einen Anstieg, wenn sich auch gesetzmäßige Beziehungen zur Menge des zugefügten Antigens nicht erkennen lassen.

Das Verhalten der übrigen Serumprotein-Fractionen ist wenig hervorstechend, so daß der Abnahme der Albumin-Fraktion am 17. Versuchstag gegenüber dem Ausgangswert, sowie der Abnahme der α_3 -Globuline am 17. Versuchstag gegenüber dem 9. Versuchstag unter Berücksichtigung der Anzahl der Versuchstiere keine Bedeutung beizumessen ist.

In Gruppe II nehmen das Präzipitineiß, der Haemagglutinationstiter und das γ -Globulin *rasch* zu, um im letzten Drittel des Versuchs auf gleicher Höhe zu bleiben. Dieses Verhalten ergibt sich für das Präzipitineiß und das γ -Globulin bei Vergleich der Kontrollwerte mit den Ausgangswerten (Tab. 19, 27), sowie für den Agglutinationstiter und das Präzipitineiß mit den jeweiligen vorhergehenden Kontrollen (Tab. 23, 27).

In dieser Gruppe lassen sich Abhängigkeiten zwischen Präzipitineiß und γ -Globulin, Agglutinationstiter und γ -Globulin sowie zwischen Präzipitineiß und Agglutinationstiter statistisch sichern (Tab. 28).

Die Beziehungen zwischen Präzipitineiweiß, Agglutinationstiter und γ -Globulin sind hier viel enger als in Gruppe I. Dementsprechend ist auch die Abhängigkeit zwischen Antigendosis und dem Präzipitineiweiß sowie dem Agglutinationstiter weitaus gesichert.

Das den Ergebnissen der Antikörpermessung parallele Verhalten des γ -Globulins spricht zusammen mit den Lokalisationsergebnissen dafür, daß dessen Zunahme durch einen Zuwachs an Antikörper bedingt ist. Da der Antikörperanteil nur einen Teil der γ -Globulin-Fraktion ausmacht, ist er allerdings kein genauer Maßstab der tatsächlich gebildeten oder vorhandenen Antikörper (28). Eine quantitative Erfassung kann daher nur zusammen mit anderen Verfahren, insbesondere der Bestimmung des präzipitierenden Eiweiß, erfolgen.

Obgleich der Gesamteiweißwert kontinuierlich zunimmt, ist ein Vergleich gegenüber den Ausgangswerten erst am 17. Versuchstag statistisch gesichert. Eine Beziehung zur applizierten Antigenmenge ist dabei nicht nachweisbar.

Das Verhalten der übrigen Serumprotein-Fractionen ist auch in Gruppe II uncharakteristisch. Insgesamt gesehen ist dabei lediglich die Zunahme verschiedener Globulin-Fractionen zu erwähnen.

Stellt man das Verhalten des Präzipitineiweißes, des Haemagglutinationstiters und des γ -Globulins beider Versuchsgruppen gegenüber, so ergeben sich bemerkenswerte Unterschiede: In der II. Gruppe (resensibilisierte Tiere) erfolgt der Anstieg des Präzipitineiweißes, des Haemagglutinationstiters und des γ -Globulins rascher und erreicht größere Werte als in Gruppe I. Während des letzten Drittels des Versuchs bleiben diese Werte praktisch unverändert (Abb. 3).

Die Prüfung auf vollständige Präzipitation wurde zu Kontrollzwecken vorgenommen. Es sollte festgestellt werden ob im vorliegenden Falle tatsächlich eine völlige Präzipitation des Antikörpers erfolgte. Wie das Ergebnis zeigt, ist nur in 10% aller Kontrolluntersuchungen ein Antikörperüberschuß nachzuweisen gewesen, wobei dieser Antikörperüberschuß zudem noch mit Antigenverdünnungen ermittelt wurde, die von vornherein keine optimalen Präzipitationsbedingungen gestatteten und die lediglich zur Ermittlung der günstigsten Präzipitationsverhältnisse verwendet wurden (6, 15, 16, 17).

Damit ist die Stichhaltigkeit der Präzipitationsreaktion erwiesen. Es ist zu folgern, daß bei sämtlichen Versuchstieren praktisch

alle Antikörper erfaßt wurden, so daß die vorliegenden Ergebnisse außerhalb zufälliger Schwankungen liegen.

Eine weitere Bestätigung dieser Annahme ergibt sich durch die Bestimmung des nicht präzipitierten Eiweißwertes. Zwischen den theoretischen (berechneten) und den tatsächlich vorgefundenen Werten besteht eine weitaus gesicherte Übereinstimmung (Abb. 4, Tab. 30).

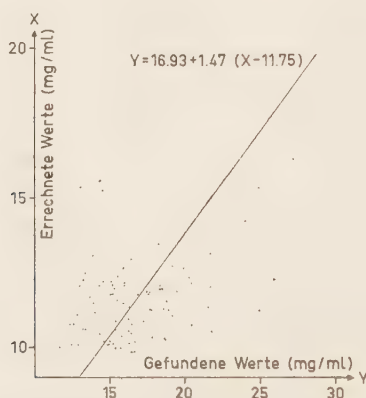


Abb. 4. zeigt die Beziehungen zwischen den errechneten und den tatsächlich gefundenen Präzipitineiweißwerten, für die die Regressionsgerade $Y = 16,93 + 1,47 (X - 11,75)$ gilt. Entsprechend den in Tab. 30 angegebenen Daten besteht eine weitaus gesicherte Übereinstimmung zwischen diesen Werten.

Es bestehen zwar Differenzen zwischen den berechneten und den vorgefundenen Eiweißmengen, jedoch sind diese durch die Schwankungen der Volumina bedingt, deren genaue Messung aus methodischen Gründen nicht möglich war. Wie aber die Untersuchungen auf Abhängigkeit zeigen, bestehen enge Beziehungen zwischen den berechneten und gefundenen Werten, worin eine Bestätigung dafür gesehen wird, daß bei der Präzipitation praktisch alle Antikörper erfaßt wurden.

Zusammenfassung

Es wird über qualitative und quantitative Antikörpermessung unter experimentellen Bedingungen berichtet. Die Untersuchungen wurden an Kaninchen vorgenommen, die mit einem chemisch und immunologisch definierten Pferdeserum als Antigen sensibilisiert wurden.

Eine Gruppe wurde erstmalig, eine weitere nach 6 Monaten nochmals sensibilisiert.

Als Antikörper wurden das Präzipitineiweiß und der Hämagglutinationstiter bestimmt. Der Antikörper konnte mit der Immuno-electrophorese und der Agglutinationselektrophorese in die γ -Globulin-Fraktion lokalisiert werden.

Ferner wurden elektrophoretische Analysen der Tierseren vorgenommen.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen wurden bei allen Tieren enge Beziehungen zwischen dem Verhalten des Präzipitineiweißes, des Hämagglutinationstitors und der γ -Globulin-Fraktion gefunden. Bei den zum zweiten Mal sensibilisierten Tieren wurde der Antikörper zu einem früheren Zeitpunkt gebildet und erreichte rasch bedeutend höhere Werte als bei den erstmalig sensibilisierten Tieren.

Kontrolluntersuchungen zur Frage einer vollständigen Erfassbarkeit gebildeter Antikörper ergaben, daß praktisch alle gebildeten Antikörper auch chemisch bestimmbar sind.

Summary

Qualitative as well as quantitative measurements of antibodies were carried out under experimental conditions. The studies were performed on rabbits sensitized by means of chemically and immunologically well defined horse serum.

One experimental group was sensitized once, another a second time after 6 months.

As for the antibody, the protein precipitate and the titer of hemagglutination were determined. Using the immunoelectrophoresis and the agglutination-electrophoresis the antibody was localized in the γ -globulin-fraction.

Further the animal sera were electrophoretically analyzed. As result of these studies all animals showed close relations between the protein precipitate, the titer of hemagglutination and the γ -globulin-fraction. In the animals sensitized a second time the formation of antibodies was found starting sooner and reaching remarkably higher levels than in the animals sensitized only once.

As to the question of the complete demonstrability of antibody formation, control examinations revealed that practically all antibodies formed may be determined chemically, too.

Literaturverzeichnis

1. Berg, G.; Frenger, W. und Scheiffarth, F.: Die Agglutinationselektrophorese (Eine Methode zum Nachweis von Antikörpern und deren Lokalisation in den Serumproteinfraktionen). *Klin. Wschr.* 1955: 767.
2. Berg, G.; Scheiffarth, F. und Frenger, W.: Zur Lokalisation heterophiler, gegen artfremde Substanzen gebildeter Antikörper mit der Agglutinationselektrophorese. *Naturwissenschaften* 1955: 515.
3. Björklund, B.: Serological Analysis of Components in Hemopoietic Tissue. *Proc. Soc. exp. Biol.* 79: 319 and 324 (1952).
4. Bordnas, A. G. et Grabar, P.: L'hémagglutination passive dans la recherche des anticorps protéiques. *Ann. Inst. Pasteur* 84: 903 (1953).
5. Boyden, S. V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. exp. Med.* 93: 107 (1951).
6. Dean, H. R.: Studies in Complement Fixation with Strains of Typhoid, Paratyphoid and Allied Organisms. *Z. Immunforsch.* 11: 58 (1911).
7. Götz, H.; Berg, G. und Scheiffarth, F.: Methodische Grundlagen der Immunoelktrophorese. *Z. Immunforsch.* 114: 72 (1957).
8. Grassmann, W. und Hannig, K.: Ein quantitatives Verfahren zur Analyse der Serumproteine durch Papierelektrophorese. *Z. physiol. Chem.* 290: 1 (1952).
9. Grabar, P.: Etudes sur les protéines à l'aide de méthodes immuno-chimiques. *Bull. Soc. Chim. biol.* 36: 65 (1954).
10. Grabar, P. and Williams, C. A.: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines; application au sérum sanguin. *Biochim. biophys. Acta* 10: 193 (1953).
11. Grabar, P. and Williams, C. A.: Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélange de substances antigéniques. *Biochem. biophys. Acta* 17: 67 (1955).
12. Heidelberger, M. and Kendall, F. E.: A quantitative study of the precipitation reaction between type III pneumococcus polysaccharide and purified homologous antibody. *J. exp. Med.* 50: 809 (1929).
13. Heidelberger, M.; Sia, R. H. P. and Kendall, F. E.: Specific precipitation and mouse protection in type I antipneumococcus sera. *J. exp. Med.* 52: 477 (1930).
14. Heidelberger, M. and Kendall, F. E.: The Precipitin-Reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody. II. Conditions for qualitative precipitation of antibody in horse-sera. *J. exp. Med.* 61: 559 (1935).
15. Heidelberger, M. and Kendall, F. E.: Precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody. Quantitative study and theory of reaction mechanism. *J. exp. Med.* 61: 563 (1935).
16. Heidelberger, M. and Kendall, F. E.: A quantitative theory of the precipitin-reaction. II. A study of an azoprotein-antibody system. *J. exp. Med.* 62: 467 (1935).
17. Heidelberger, M. and Kendall, F. E.: A quantitative theory of precipitin reaction. III. The reaction between crystalline egg albumin and its homologous antibody. *J. exp. Med.* 62: 697 (1935).
18. Heidelberger, M. and Kendall, F. E.: Quantitative studies on antibody purification. Dissociation of precipitates formed by pneumococcus specific polysaccharides and homologous antibodies. *J. exp. Med.* 64: 161 (1936).
19. Heidelberger, M. and Kabat, E. A.: Quantitative studies on antibody purification. II. The dissociation of antibody from pneumococcus specific precipitates and specifically agglutinated pneumococci. *J. exp. Med.* 67: 189 (1938).
20. Heidelberger, M. and MacPherson, C. F. D.: Quantitative micro-estimation of antibodies in sera of man and other animals. *Science* 97: 405 (1943).

21. *Kaminski, M. et Ouchterlony, Ö.*: Etudes immunochimiques, qualitatives et quantitatives des protéides du blanc d'œuf. *Bull. Soc. Chim. biol.* 33: 758 (1953).
22. *Middlebrook, G. and Dubos, R. F.*: Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. *J. exp. Med.* 88: 521 (1948).
23. *Ouchterlony, Ö.*: Antigen-antibody reaction in gels. *Ark. Kem. Mineral., Geol. Ser. B* 26: Nr. 14 (1948).
24. *Rindom Schiött, C.*: Preliminary studies on antigen-antibody reactions in gels according to Ouchterlony's method. *Acta path. scand.* 32: 251 (1953).
25. *Scheiffarth, F.; Berg, G. und Frenger, W.*: Neuere Methoden zum Nachweis und zur Lokalisation von Antikörpern. *Klin. Wschr.* 1956: 134.
26. *Scheiffarth, F.; Götz, H. und Frenger, W.*: Möglichkeiten und Grenzen der Immuno-elektrophorese. *Ärzt. Wschr.* 1956: 573.
27. *Scheiffarth, F. und Frenger, W.*: Die Verwendbarkeit der passiven oder indirekten Hämagglutinationsreaktion nach Boyden beim Nachweis von Antikörpern. *Blut* 2: 102 (1956).
28. *Scheiffarth, F.; Berg, G.; Legler, F. und Schuler, E.*: Zur Frage des Einflusses von ACTH und Cortison auf die Antikörperbildung. *Arzneimittel-Forsch.* 7: 360 (1957).
29. *Scheiffarth, F. und Berg, G.*: Serumeiweißbestimmungen bei Ratten und Kaninchen mit der Papierelektrophorese. II. Mitteilung: Der Einfluß des Sensibilisierungsmodus auf das Verhalten der Serumeiweißkörper bei gleichem Antigen. *Z. exp. Med.* 123: 201 (1954).
30. *Uriel, J. et Scheidegger, J.*: Electrophorèse en gélose et coloration des constituants. *Bull. Soc. Chim. biol.* 37: 165 (1955).

Adresse des Autors: Prof. Dr. F. Scheiffarth, Medizinische Universitätsklinik, Krankenhausstraße 12, Erlangen (Deutschland).

LEBENS LAUF

Als Sohn des Arztes Dr. Robert Roller und dessen Ehefrau Frida, geb. Baldermann wurde ich am 25. 4. 1931 in Bergstadt, Kr. Römerstadt, Sudeten geboren. Von 1937 bis 1941 besuchte ich die Volksschule in Bergstadt, von 1941 bis 1945 die Oberschule in Römerstadt. Im Oktober 1946 wurde ich nach Bayern ausgesiedelt. Ab 1947 besuchte ich dann die Oberrealschule in Hof/Saale und erhielt das Reifezeugnis der Oberrealschule vom 17. 7. 1952.

Mit dem Wintersemester 1952/53 begann ich das Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen und nach 5 vor-klinischen Semestern bestand ich im Februar 1955 die ärztliche Vorprüfung. Nach sechs klinischen Semestern legte ich im Sommer 1958 das medizinische Staatsexamen ab.

